

## 凍結保存後加熱処理がウェルシュ菌 NCTC 8798 の孢子形成能およびエンテロトキシン産生能におよぼす影響

谷 口 忠 敬 ・ 中 村 寧

### Influence of Heating Treatment after Freezing Storage on the Spore Forming and Enterotoxin Producing Abilities of *Clostridium perfringens* NCTC 8798

Tadataka TANIGUTI and Yasushi NAKAMURA

The influence of the heating treatment after the freezing storage on the spore forming and enterotoxin producing abilities of the culture solutions of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 has been studied.

1) The spore forming ability of the strain NCTC 8798 was increased more definitely by the heating (75°C, 20 min.) after the freezing storage (−20° or −30°C, 1~6 days) of the cooked meat culture (37°C, 3 days) solutions than by the only heating of the culture solutions.

2) The enterotoxin producing, spore forming and heat-resistant (100°C, 10 min.) spore forming abilities after the heating of the culture solutions which were stored at −20°C for 6 days were higher than those of the culture solutions which were stored at −20°C for one day.

3) The spore forming ability which was elicited by the heating after the freezing storage (−20°C, 5 days) was maximum when the freezing (−20°C) - thawing (37°C) was applied one time to the culture solutions before the freezing storage, and the ability diminished when the freezing - thawing was repeated 2 and 4 times.

#### 緒 言

ウェルシュ菌は嫌気性孢子形成細菌であり，食中毒の原因となる。本菌による食中毒の主たる原因食は加熱調理食品であり（１），摂取された本菌が腸管内で増殖し孢子を形成する際にエンテロトキシンを産生するために食中毒が引き起こされる（２）。

分離菌株の起病性の診断に当っては，孢子形成培養におけるエンテロトキシン産生の確認が要求されるが，分離菌株の培養保存において孢子形成能の低下する場合がある。一般に，本菌の孢子形成培養においては，孢子を順調に形成させるために接種菌に加熱処理（75℃，20分間）を加える方法（３）が多く採用されてい

る。また，加熱処理と培養の反復によって孢子形成能およびエンテロトキシン産生能が上昇する（４）と云われる。

一方，菌株を凍結保存した場合にも保存中に加熱処理後の孢子形成能およびエンテロトキシン産生能における変動がしばしば認められる。また，本菌の孢子が凍結処理に抵抗性を有することは Canada ら（５）によって報告されており，冷凍食品からの本菌の検出（６）も報告されている。

従って，凍結保存が加熱処理による本菌の孢子形成能およびエンテロトキシン産生能の上昇におよぼす影響を明らかにすることは食品衛生上から有意義であると考えられる。本報では，菌株 NCTC 8798 を用い，

凍結保存後加熱処理が本菌の孢子形成能およびエンテロトキシン産生能におよぼす影響について検討を加えた。

## 実験方法

### 1 供試株

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) NCTC 8798 を供試した。供試株はクックドミート培地（以下CM培地と略記）で37℃、3日間培養後、-20℃に凍結保存した。

### 2 培養菌液の凍結保存と凍結保存後の加熱処理

凍結保存培養（実験方法1）の0.1 mlをCM培地10mlに接種し、37℃で3日間培養した。この培養菌液を、滅菌バイアルに1 mlずつ分注し、凍結保存に供した。凍結保存は-30℃、24時間、あるいは-20℃、1～6日間とした。次に、凍結保存が終了した菌液を37℃で融解後、この菌液に75℃、20分間の加熱処理を加えた。

### 3 孢子形成能の測定

1) 供試菌液：CM培養（37℃、3日間培養）菌液および凍結保存、加熱処理あるいは凍結保存後加熱処理を行なった同菌液を孢子形成能の測定に供試した。

2) 孢子形成能の測定：供試菌液の0.1 mlをCM培地10mlに接種後、37℃で16時間培養した。この培養菌液の1 mlを孢子形成培地100mlに接種し37℃で9時間培養した。この孢子形成培養における孢子形成率を供試菌液の孢子形成能とした。なお、CM培養はバイアルを用い、孢子形成培養は培養びんを用いて行なった。孢子形成培地としてはDS培地（7）に改変を加えたL-アスコルビン酸ナトリウム添加培地を使用した。すなわち、培地組成はポリペプトン1.5%、酵母エキス0.4%、可溶性デンプン0.4%、リン酸水素2ナトリウム（12水塩）1.4%およびL-アスコルビン酸ナトリウム0.5%とした。孢子形成率は、孢子形成培養菌液2 mlを等量の生理食塩水に懸濁させ、5℃で遠心分離（3000 rpm、10分間）した菌体を10%中性ホルマリン4 mlに懸濁させた後、位相差顕微鏡で検鏡して算出した。

### 4 エンテロトキシン産生量の測定

孢子形成培養菌液96 mlを遠心分離（5℃、8000rpm、20分間）後、菌体を生理食塩水2 mlに懸濁させる。次に細胞を超音波破壊器で氷冷しながら完全に破壊し、これをエンテロトキシン（以下ETと略記）検出用の細胞抽出液とした。ET量はOuchterlonyのマイクロスライド2重拡散法によって測定し、その詳細は前報（8）に記述した。

### 5 耐熱性孢子数の測定

便宜上、孢子形成培養菌液の2 mlを-20℃に凍結保存しておき、これを試料とした。すなわち、凍結保存菌液を融解し、これに100℃、10分間の加熱を行なった後、急冷した。次に、希釈水（チオグリコール酸ナトリウム0.1%、ポリペプトン1.0%含有）で段階希釈し、各希釈液1 mlを抗生物質無添加TSN寒天培地（9）10mlに接種・混合して平板とした。これを水素ガス置換嫌気ジャー中に入れ、37℃で2日間培養後、コロニー数を測定して耐熱性孢子数とした。

## 実験結果

### 1 培養菌液の凍結保存および加熱処理がウェルシュ菌の孢子形成能におよぼす影響

同一菌株でも培養菌液の状態によって、凍結保存および加熱処理に対する菌液中細胞の抵抗性の分布が異なると思われる。NCTC 8798の培養菌液に対し凍結保存（-30℃で24時間、-20℃で5あるいは6日間）も加熱処理（75℃で20分間）も加えない場合、凍結保存のみあるいは加熱処理のみを加えた場合、および凍結保存後に加熱処理を加えた場合の孢子形成能を測定し、その結果をTable 1に示した。

培養菌液の孢子形成能は凍結保存のみによっては上昇せず、また加熱処理のみによっては上昇する場合としない場合が認められた。これに対し、加熱処理前に凍結保存した場合には孢子形成能の上昇が加熱処理のみの場合に比べて高く、特に加熱処理単独では効果がない場合に予め凍結保存することによって孢子形成能が著しく上昇したことが特徴的であった。

### 2 培養菌液の凍結保存時間がウェルシュ菌の加熱処理後の孢子形成能およびET産生能におよぼす影響

NCTC 8798の培養菌液を-20℃の冷気中に1日および6日間凍結保存した場合および凍結保存しなかった場合の加熱処理後の孢子形成能およびET産生能を測定し、その結果をTable 2に示した。

加熱処理後の孢子形成能およびET産生能におよぼす凍結保存の効果は1日間凍結のときよりも6日間凍結のときに高い傾向が認められた。すなわち、1日間凍結の場合には、耐熱性孢子数は凍結保存しない場合（加熱処理のみ適用）のそれと大差なく、またET産生は凍結保存の有無にかかわらずすべて陰性であった。一方、6日間凍結の場合には、孢子形成率および耐熱性（100℃、10分間）孢子数の両者において、凍結保存した方がしない方よりも高い値を示した。また、ET産生も6日間凍結保存の方のみにおいて認められた。

Table 1. Influence of the freezing storage and heating treatment of the cooked meat culture solutions on the spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798.

Samples and conditions for freezing and heating			Sporulation rate (%) in sporulation cultures
Samples	Freezing	Heating (75°C, 20 min.)	
a	+ (-30°C, 1 hr.)	+	46
	-	+	1
	+ (-30°C, 1 hr.)	-	1
	-	-	1
b	+ (-30°C, 24 hr.)	+	84
	-	+	80
	+ (-30°C, 24 hr.)	-	8
	-	-	4
c	+ (-20°C, 5 days)	+	75
	-	+	1
	+ (-20°C, 5 days)	-	1
	-	-	1
d	+ (-20°C, 6 days)	+	77
	-	+	30
	-	-	1
e	+ (-20°C, 6 days)	+	82
	-	+	66
	-	-	3

Samples : cooked meat culture solutions incubated at 37°C for 3 days.

Heating : applied after the freezing.

Sporulation cultures : incubation, at 37°C for 9 hours; medium, the modified DS medium in which 0.5 % sodium L-ascorbate was added instead of sodium thioglycollate.

Table 2. Influence of the heating treatment after the freezing storage of the cooked meat culture solutions on the spore forming, heat-resistant spore forming and enterotoxin producing abilities of *Clostridium perfringens* NCTC 8798.

Samples and conditions for freezing and heating			Sporulation cultures		
Samples	Freezing	Heating (75°C, 20 min.)	Sporulation rate (%)	No. of heat-resistant spores/ml	Titer of enterotoxin
d	+ (-20°C, 6 days)	+	77	$56 \times 10^5$	1
	+ (-20°C, 1 day)	+	44	$45 \times 10^4$	neg.
	-	+	30	$43 \times 10^4$	neg.
e	+ (-20°C, 6 days)	+	82	$12 \times 10^6$	2
	+ (-20°C, 1 day)	+	73	$60 \times 10^5$	neg.
	-	+	66	$60 \times 10^5$	neg.

Samples, heating and sporulation cultures : see Table 1.

Heat-resistance : at 100°C for 10 min.

Titer of enterotoxin : expressed as the maximum dilution of the cell extract solutions at which precipitation was formed in microslide gel by Ouchterlony's double diffusion method.

### 3 凍結—融解回数が凍結保存後の加熱処理によってもたらされた孢子形成能におよぼす影響

NCTC 8798 の培養菌液に凍結保存（ $-20^{\circ}\text{C}$ ，5日間）前に凍結—融解（ $-20^{\circ}\text{C}$ 冷気中で25分間保持して凍結後， $37^{\circ}\text{C}$ で融解）を0～4回加えた場合の，凍結保存—加熱処理後における孢子形成能を測定比較した。測定結果を Fig. 1 に示した。

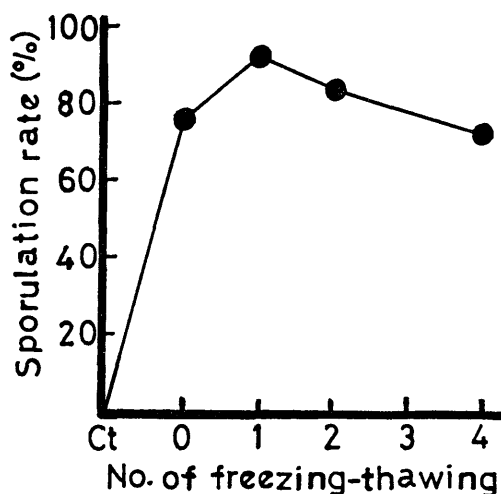


Fig. 1. Influence of the number of the freezing-thawing before the freezing storage of the cooked meat culture solution on the increasing of the spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 by the heating treatment after the freezing storage.

Freezing-thawing : frozen in cold air at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 25 min., thawed in a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ .

Freezing storage : at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5 days.

Heating treatment : at  $75^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

Sporulation cultures : the medium and the conditions for the incubation are the same as those in Tabel 1.

Ct : in which the only heating treatment was applied without the freezing-thawing and freezing storage.

Cooked meat culture : incubation, at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 days.

すなわち，加熱処理のみの適用で孢子形成能の上昇が殆どなく孢子形成率1%以下であったものでも，凍結保存後加熱処理によって孢子形成能が明確に上昇した。この凍結保存後加熱処理によってもたらされた孢子形成能は凍結保存前に凍結—融解を1回加えた場合に最大であった。また，凍結—融解を2回および4回加えた場合にはその孢子形成能は減少した。

### 考 察

一般に自然界から加熱処理によって耐熱性菌株を選別分離した場合，分離株の多くは孢子の形成は悪いが耐熱性が強い。これは孢子形成過程のどこかに，加熱による遺伝的欠損を生じ，その結果として耐熱性機構は有しているが，ほんのわずかしき孢子を作らないのであろうと云われている（10）。NCTC 8798 の場合も培養菌液によっては， $75^{\circ}\text{C}$ ，20分間の加熱処理を加えても孢子形成能が上昇しない場合が認められた。恐らくこの場合も，上述のような理由によって孢子形成能の低下があっても上昇は見られなかったのであろう。

一方，NCTC 8798 の場合，加熱処理のみによって孢子形成能が上昇しないときに，予め凍結保存してから加熱処理すると孢子形成能が上昇した。この事実は恐らく，処理前培養菌液中の孢子の大部分は加熱処理によって遺伝的欠損を生ずるが，予め凍結保存された場合には凍結処理によって軽度の損傷を受け，次の加熱処理によって死滅すること，また，処理前培養菌液中の孢子の一部すなわち成熟孢子は凍結保存および次に続く加熱処理による損傷を受けず完全な状態で選択的に生残し，その結果として孢子形成能が上昇した可能性を示唆するものと思われる。ちなみに細菌孢子は水分含有量が特に低く（11），凍結処理に対しても耐性が強いと云われる。

NCTC 8798 の培養菌液において，凍結—融解を数回繰り返した後に凍結保存し次に加熱処理した場合の孢子形成能は凍結保存後加熱処理のみによった場合に比べて低かった。この事実は，凍結保存に完全に耐え得る孢子でも，凍結—融解が繰り返されると軽度の凍結障害を起こし，次の凍結保存に続く加熱処理によって孢子形成過程における遺伝的欠損を生じた孢子が増加した可能性を示唆するものと思われる。従って，凍結保存中における温度の変動が激しい場合には凍結保存後の加熱処理により孢子形成能が低下することも考えられる。

### 要 約

凍結保存に続く加熱処理がウェルシュ菌 NCTC 8798 の孢子形成能およびエンテロトキシン産生能におよぼす影響を検討した。

1) NCTC 8798 の孢子形成能はクックドミート培養（ $37^{\circ}\text{C}$ ，3日間）菌液に対し加熱処理（ $75^{\circ}\text{C}$ ，20分間）のみを加えた場合よりも凍結保存（ $-20^{\circ}$ あるいは $-30^{\circ}\text{C}$ ，1～6日間）後に加熱処理を加えた場合に顕著に上昇した。

2) 培養菌液を6日間凍結(−20℃)保存した場合は、1日間凍結保存した場合に比べ、加熱処理後におけるエンテロトキシン産生能、孢子および耐熱性(100℃, 10分間)孢子の形成能が高かった。

3) 凍結保存(−20℃, 5日間)後加熱処理によってもたらされた孢子形成能は凍結(−20℃)→融解(37℃)を凍結保存前に1回加えた場合に最大であった。凍結→融解を2および4回加えた場合にはその孢子形成能は減少した。

#### 引用文献

- 1) 豊川行平・宮木高明・辺野喜正夫(1972). 新編食品衛生学. 朝倉書店, 東京, 120.
- 2) Hauschild, A. H. W. (1973). *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **6**, 106-110.
- 3) Labbe, R., Somers, E. and Duncan, C. (1976). *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 455-457.
- 4) Uemura, T. (1978). *J. Appl. Bacteriol.*, **44**, 411-419.
- 5) Canada, J. C., Strong, D. H. and Scott, L. G. (1964). *Appl. Microbiol.*, **12**, 273-276.
- 6) Strong, D. H., Canada, J. C. and Griffiths, B. B. (1963). *Appl. Microbiol.*, **11**, 42-44.
- 7) Duncan, C. L., and Strong, D. H. (1968). *Appl. Microbiol.*, **16**, 82-89.
- 8) 谷口忠敬(1978). 食衛誌, **19**, 195-200.
- 9) Marshall, R. S., Steenbergen, J. F. and McClung, L. S. (1965). *Appl. Microbiol.*, **13**, 559-563.
- 10) 西田尚紀(1976). 食衛誌, **17**, 1-11.
- 11) Ross, K. F. A., and Billing, E. (1957). *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 418-425.